

ARTÍCULO ORIGINAL

Expresión del gen DD3PCA3 en cáncer de próstata e hiperplasia prostática benigna. Estudio en el Hospital Central Militar de México

Floriano-Sánchez E.,^{1,2} Amador-Ortega J.,^{1,3} Castro-Marín M.,⁴ Torres-Salazar J.J.,⁴
Ricardos-Espinoza A.A.,⁴ Tavera-Ramírez G.,⁴ López-Silvestre J.C.,⁴ Aboytes-Velásquez E.A.⁴

RESUMEN

El 70% de los casos de cáncer de próstata se detecta en estadios avanzados, por lo que el gen DD3 PCA3 es un interesante marcador candidato para el diagnóstico y pronóstico, ya que es uno de los más específicos para el cáncer de próstata.

Objetivo. Determinar y analizar la expresión del gen DD3 PCA3 en tejidos con cáncer de próstata e hiperplasia prostática benigna.

Métodos. En este estudio realizamos la cuantificación del mRNA del gen DD3, desarrollando la metodología para determinar la expresión génica usando la transcripción reversa-PCR en tiempo-real (Rotor-Gene 3000).

Resultados. La expresión del gen se determinó en cáncer de próstata y se comparó con hiperplasias benignas, expresándose 30.4 veces más ($p < 0.0001$) en las neoplasias; el promedio de expresión para las neoplasias e hiperplasias fueron de 1745 y 57.4, respectivamente.

Conclusiones. En este estudio encontramos que hay expresión del gen DD3PCA3 significativamente mayor en las neoplasias, en comparación con las hiperplasias, por lo que este gen puede ser

SUMMARY

In 70% of the cases, the prostate cancer is detected in advanced stadiums, for that the gene DD3 PCA3 is an interesting marker candidate for diagnose and predict, since it's one of those but specific for the prostate cancer.

Objective. To determine and to analyze the expression of the gene DD3PCA3, in tissue with prostate cancer and BPH.

Methods. In this study we carry out the quantification of the mRNA of the gene DD3PCA3 developing the methodology to determine the expression using the transcription reverse-PCR time-real (Rotor-Gene 3000).

Results. The expression of the DD3PCA3 was determined in prostate cancer and it was compared with benign hyperplasia, being expressed 30.4 times ($p < 0.0001$) in the neoplasm; the expression average for the neoplasm and hyperplasia was respectively of 1745 and 57.4.

Conclusions. In this study we found that there is expression of the gene significantly bigger DD3PCA3 in the neoplasm compared with the hyperplasia; for that this gene can be used as a marker early tumoral, being carried out in biopsies of patient with suspicion of prostate cancer.

Key words: prostate cancer, DD3PCA3, RT-PCR in real-time, BPH, tumoral markers.

1 Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Escuela Médico Militar; 2 Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional; 3 Tecnológico de Estudios Superiores de Huixquilucan; 4 Servicio de Urología, Hospital Central Militar

Correspondencia: Esaú Floriano Sánchez, MSci. Escuela Médico Militar. Torre de Laboratorios, 5º Piso, Cerrada de Palomas y Batalla de Celaya, Col. Lomas de San Isidro, Delegación Miguel Hidalgo, México, D.F., 11200. Tel.: +52 5540-7732 ext. 175; Fax: +52 5520-2121. Correo electrónico: floriano_esa@yahoo.com

utilizado como un marcador temprano tumoral, realizándose en biopsias de pacientes con sospecha de cáncer de próstata.

Palabras clave: cáncer de próstata, DD3PCA3, RT-PCR en tiempo-real, BPH, marcadores tumorales.

INTRODUCCIÓN

En México el cáncer de próstata (CaP) es la principal causa de consulta en los servicios de Urología, y en 70% de los casos se presenta en estadios avanzados. El carcinoma de próstata ocupa actualmente el segundo lugar en frecuencia dentro de las neoplasias del sexo masculino, sólo superado por el cáncer de piel y es la segunda causa de muerte en hombres después del cáncer de pulmón.¹

En Estados Unidos, más de 200,000 hombres son diagnosticados anualmente con cáncer de próstata y 30,000 mueren cada año por esta enfermedad.² En este mismo país, durante 2005 se presentaron 232,090 casos nuevos y 30,350 hombres murieron por esta enfermedad.³

Dentro de la diversas razas, los afroamericanos muestran la tasa de incidencia más elevada de CaP, ya que su incidencia global aumentó de 124/100,000, a 250/100,000 (102%). Por su parte, los hispanoamericanos tuvieron una incidencia intermedia de 104/100,000. Los países asiáticos, sobre todo Japón y China, presentan una de las tasas más bajas de incidencia y mortalidad por cáncer de próstata en el mundo; por ejemplo, entre 1992 y 1995 en Japón, fue de 4/100,000.⁴

En un principio, la cifra de 4 ng/ml fue establecida como valor normal del antígeno prostático específico (PSA) y se supuso que todo valor por encima de este podría estar con relación a un carcinoma de próstata; sin embargo, la sensibilidad de este valor no supera 85% y su especificidad es levemente superior a 60%,⁵ debido a que el PSA es un tejido específico (prostático) y no un cáncer específico de próstata y que, por otro lado, las cifras séricas de PSA dependen del volumen de la zona de transición epitelial de la

próstata.⁶ Hasta el momento, se tiene claro que la especificidad de la prueba de PSA no es la ideal, ya que entre 20-25% de los hombres con niveles séricos de PSA considerados dentro del rango normal (2.5-4 ng/ml), pueden tener CaP.⁷⁻⁹

Por lo general, los pacientes con CaP limitado a este órgano son tratados con cirugía radical o radioterapia y en la mayoría de los casos el control es exitoso. Como alternativa, si el tumor se ha diseminado localmente o más allá, el tratamiento androgénico es la terapia usual. Infortunadamente, en estos últimos pacientes, la enfermedad se sigue desarrollando y no se tiene disponible un tratamiento efectivo.^{10,11}

Esta limitación replantea la necesidad de profundizar en el estudio molecular de la patología prostática para perfilar y/o complementar con nuevos marcadores para diagnóstico,^{5,12,13} de ahí la necesidad de desarrollar nuevas pruebas de detección más exactas y en lo posible, menos invasivas que puedan identificar con mayor precisión esta patología en etapas más tempranas limitadas a este órgano.

En los últimos años, está creciendo en forma considerable tanto el número de biomarcadores potenciales como el conocimiento de la etiología del CaP. Gracias al desarrollo de metodologías en el campo de la biología molecular se están descubriendo pruebas diagnósticas que podrán diferenciar en etapas más tempranas entre el cáncer de próstata y las patologías benignas de este órgano.¹⁴⁻¹⁹

Algunos de los nuevos marcadores que se están desarrollando en el campo de la biología molecular, los genes más estudiados incluyen: DD3PCA3, también conocido como PCA3 (DD3PCA3), hipermetilación de glutatión-S-transferasa-1 (GSTP1), un gen fusionado producto de TM-PRSS2, ERTV114-17, UDP-N-Acetyl-Dgalactosamina transferasa, Hep-sina, PSMA18, la telomerasa (hTERT)19, PSGR y el PCGEM1.^{20,21}

Descubierto en 1999 (Schalken, *et al*), el DD3 PCA3 es uno de los genes más específicos para el cáncer de próstata. Su producto de transcripción es un mRNA no codificante localizado en el cromosoma 9 (9q21.22), de 25 kb, consistente de 3 intrones y 4 exones y con dos alternativas de empalme (*splicing*) del exon 2; tiene sitios que pueden poliadenilarse y colocar al exón 4 en tres posiciones. Por

lo tanto, puede tener diferentes productos de transcripción (exones 1, 3, 4 y 4b).^{16,22}

En los estudios realizados sobre este marcador (DD3PCA3), se ha determinado que se sobreexpresa en tejido de CaP, con una baja expresión en tejido prostático normal o en hiperplasia prostática benigna (HPB), con gran sensibilidad y especificidad para diferenciar estos tejidos. En la actualidad se encuentra bajo estudio su utilidad en la clínica para ser cuantificado en las biopsias de próstata o en fluidos corporales.^{16,22-29}

Por otra parte, en los últimos años se han desarrollado diferentes metodologías para determinar la expresión génica,^{30,31} con grandes avances gracias a la aplicación de técnicas de biología molecular; sin embargo, las estrategias y resultados todavía difieren, de tal manera que la determinación de la expresión génica por retrotranscripción reversa-PCR (RT-PCR) en tiempo real es una metodología reciente. La técnica es muy compleja, con varios problemas asociados con su sensibilidad, reproducibilidad, especificidad y con problemas inherentes a cualquier técnica cuantitativa por RT-PCR en tiempo-real, por lo que el interés de realizar este estudio fue desarrollar nuestra metodología para la determinación de la expresión génica por RT-PCR en tiempo real, cuantificar la expresión absoluta (mRNA) del gen DD3PCA3 en tejidos de CaP y en tejidos de HPB y comparar los resultados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Sujetos de estudio. Previa autorización por consentimiento informado de los pacientes, se obtuvieron 40 muestras de tejido prostático por medio de diferentes procedimientos quirúrgicos (resección trasuretral, biopsias trasrectales, cirugía abierta); 20 de estos tejidos contaban con diagnóstico previo de CaP (Servicio de Urología del Hospital Central Militar, México). El periodo comprendido fue de diciembre de 2004 a julio de 2006, en todos los casos se realizó el estudio histopatológico (escala de Gleason), en el que se especificó el grado histológico del tumor, o en su caso, confirmación de patología benigna. Los tejidos obtenidos se mantuvieron a una temperatura de -83°C (Revco® Legaci ULT2186 3-35 Dupont SVVA Refrigerants) hasta su posterior procesamiento.

Extracción y cuantificación de RNA

El RNA total fue extraído con el kit de extracción de RNA total utilizando el *SV Total RNA Isolation System* (Promega, Madison, WI, EUA). Se tomaron 150 mg de cada una de las muestras con técnica estéril, evitando contaminación de RNAsas, homogenizándolas con un politrón (Omni µH International), siguiendo las indicaciones del proveedor, a la elusión final de RNA total. Por último, se les agregó 2 µL de inhibidor de RNAsas y se guardaron a -83°C para posteriores análisis. La verificación de la integridad del RNA total se realizó por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 2%, colocando 6 µL del RNA total extraído por muestra y se visualizaron las bandas con luz UV (EDAS 290 KODAK). La cuantificación del RNA total se llevó a cabo por medio de fluorescencia con SYBR Green, con el multidetector *Synergy HT-I* (BIO-TEK Instruments, Inc. Highland Park, Vermont, USA).

Estandarización de la técnica de RT-PCR.

Para el desarrollo de la RT-PCR en tiempo real se diseñaron oligonucleótidos específicos (primers) del gen de interés (DD3PCA3) y para los genes de referencia (candidatos endógenos): subunidad ribosomal 18s, gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH), glucosa 6 fosfato deshidrogenada (G6PDH) y β-actina (BACT). Los genes endógenos se validaron con el software BestKeeper³² y se tomó el más estable como control endógeno de la carga de RNA total.

Las secuencias fueron obtenidas del GenBank™ (Tabla 1). La búsqueda de las secuencias se realizó en (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) para confirmar su especificidad. Los primers sintetizados (Invitrogen, Carlsbad, CA) fueron: gen de interés DD3PCA3; genes candidatos endógenos: BACT, 18s, GAPDH y el gen G6PDH, los cuales fueron optimizados a una temperatura de 57°C (Tabla 1).

Las condiciones para la RT-PCR fueron optimizadas con un termociclador de gradiente (gradient Px2 Thermal Cycler Hybaid, Franklin, MA) utilizando el kit *SuperScript™ III Platinum® SYBR® One-Step qRT-PCR Kit with ROX* (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las secuencias tomadas corresponden a los registros en el GenBank™ bajo el siguiente número de accesiones: DD3PCA3, AY894120; BACT, NM_001101; GAPDH, NM_002046; subunidad 18s, X03205; y G6PDH, NM_004285.

Tabla 1. Secuencia de los primers que se usaron en la RT-PCR, de izquierda a derecha, nombre del gen, posición de fragmento de amplificación, secuencia de los primers, tamaño del fragmento de amplificación, la accensión (GenBank™) y eficiencia.

Primers utilizados en la RT-PCR en tiempo real					
Blancos	Posiciones	Secuencia del nucleótido	Longitud del amplicón	Acceso del GenBank™	Eficiencia de los primers
BACT	1031-1173	F: CTGGCACCCAGCACAATG R: GGGCCGGACTCGTCATAC	143pb	NM_001101	2.70
18S	1601-1713	F: GTAACCCGTTGAACCCATT R: CCATCCAATCGGTAGTAGCG	151pb	X03205	2.6
DD3	98-253	F: GGGAAGGACCTGATGATACAGAG R: GCTGCAACTGAGTACTCAAGAAAGTG	156pb	AY894120	2.27
GAPDH	446-620	F: GAGCCAAAAGGGTCATCATCTC R: CCTCCACGATACCAAAGTTGTC	175pb	NM_002046	2.04
G6PDH	1777-1935	F: CCTGGAGGAGCTGAGAATGG R: CGGGCTCTCTCGGTACTTG	159pb	NM_004285	2.66

Los productos de amplificación por RT-PCR fueron visualizados por electroforesis en un gel de agarosa al 2% y estudiados con el sistema de análisis de electroforesis EDAS 290, (KODAK, New Haven, CT) (Figura 2).

Los resultados obtenidos de las amplificaciones, como son las condiciones de temperatura, concentraciones de primers, dNTPs (nucleótidos) y volúmenes, fueron transferidos al protocolo de amplificación en tiempo real con el sistema de detección *Rotor gene 6.0* (Corbett Life Science, Sidney City, Australia).

Protocolo de RT-PCR en tiempo real Rotor-Gene 3000. Las reacciones de la RT-PCR en tiempo real se realizaron con aproximadamente 10 ng de RNA total. Las diluciones para la validación del control endógeno, cuantificación absoluta y la determinación de las eficiencias de todos los primers, se realizaron usando el kit *SuperScript™ III Platinum® SYBR® One-Step qRT-PCR Kit with ROX*, con una concentración final de los reactivos como sigue: 6.25 µl 2X SYBR® Green, 0.4 mM por cada dNTP y 6 mM MgSO₄, 4 µl RNA total, 0.25 µl SYBR® Green One Step Enzyme Mix, 0.4 µl MgCl₂ (50 mM), 0.4 µl del primer forward (0.4 µM), 0.4 del primer reverso (0.4 µM), y 0.8 µl de agua libre de RNAsa, 12.5 µl de volumen final.

La reacción se llevó a cabo inicialmente a 52°C durante 10 minutos para la síntesis de cDNA y a 94°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos en la fase de PCR, cada ciclo de 95°C por 20 segundos (s), 57°C por 20 s, 72°C por 20 s, la fase de desnaturación tuvo un intervalo de temperatura de 60-98°C. Para la cuantificación absoluta fue necesaria la construcción de dos curvas estándar.

La expresión tanto de los genes candidatos endógenos (GADPH, G6PDH, BACT y 18s) como del gen de interés (DD3PCA3) fueron cuantificados en forma individual para ser analizados con el modelo estadístico *BestKeeper* para la validación de los endógenos y con el modelo estadístico *REST®* para el análisis de las eficiencias. Para la cuantificación absoluta se normalizaron los datos con el gen endógeno, utilizando las dos curvas estándar para ambos genes.^{32,33}

Análisis de los datos

Los datos de los CTs (El CT es definido como el número de ciclos en el cual la intensidad de fluorescencia aumenta por arriba de la fluorescencia basal de dicha muestra) fueron exportados del software *Rotor-Gene 6.0* (Corbett Life Science, Sidney City, Australia), para calcular las eficiencias con el modelo estadístico *REST®* y los datos fueron grafica-

Tabla 2. Determinación del gen endógeno más estable. Los datos (CTs) fueron analizados con un reciente modelo estadístico Best-Keeper (Pfaffl Michael W, *et al*, 2004) el cual correlaciona un conjunto de genes propuestos (genes candidatos) y valida al más estable de estos genes (GAPDH), en nuestro estudio GAPDH fue el gen más estable con una correlación de Pearson de 0.953 y una $p=0.008$.

	BACT vs BK	B2M vs BK	GAPDH vs BK	G6PDH vs BK
Coefficiente de correlación [r]	0.940	0.868	0.953	0.070
Pendiente	1.522	1.083	1.100	0.044
Desviación estándar [DE]	± 0.565	± 0.636	± 0.136	± 0.643
Valor de p	0.008	0.025	0.007	0.895

dos utilizando una tabla de *Excel*, construyendo una regresión lineal donde se compara la concentración logarítmica (RNA total) contra los CTs.³³

Para correlacionar los genes endógenos candidatos y determinar el gen más estable se utilizó el software *BestKeeper*, exportando los CTs del software *Rotor gene 6.0* a una tabla de *Excel* (Tabla 2).

Los datos de las muestras que fueron sometidas al protocolo de disociación con temperatura de 60-98°C fueron analizados con el software *Rotor gene 6.0* y los datos exportados y graficados utilizando una tabla de *Excel* para mostrar la temperatura de disociación (*melting*) característica de cada producto amplificado (Figura 3).

Los datos de las cuantificaciones absolutas de todas las muestras se normalizaron con el gen endógeno y se analizaron con la prueba estadística *t* de student, comparando ambos grupos (CaP y HPB), considerando la significancia estadística con $p < 0.05$; los resultados (\pm SEM) fueron graficados con el software *PRISMA*.

RESULTADOS

De las 20 muestras de CaP y de las 20 de HPB, se extrajo el RNA total, se cuantificaron cada una de ellas por medio de fluorescencia y se comprobó la integridad de las muestras (Figura 1). La especificidad de los productos amplificados se verificó como se observa en las figuras 2 y 3.

Se determinó en forma independiente las eficiencias de cada uno de los genes endógenos y del gen de interés como se describe en la metodología; se tomaron los CTs por triplicado de las diluciones

(10-0.001ng de RNA total) amplificadas. Los resultados para los genes endógenos, BACT, G6PDH; 18S; GAPDH, y el gen de interés DD3PCA3 se observan en la Tabla 1 y en la Figura 4.

Para poder determinar el endógeno más estable y adecuado, se realizó la RT-PCR en tiempo real por triplicado de cada una de las muestras de HPB, así como de CaP y se compararon tomando las CTs (la media del triplicado de cada muestra); estos datos se exportaron al modelo estadístico *BestKeeper*, el cual analiza los datos y determina el gen endógeno más estable; el gen GAPDH presentó una estabilidad superior a los otros tres ($p < 0.007$) (Tabla 2).

El número de copias absolutas del mRNA de DD3PCA3 fue determinado en los 20 tejidos con HPB y 20 tejidos con CaP; el número absoluto de copias fue normalizado para la cuantificación del gen. En los tejidos con CaP, el gen DD3PCA3 se expresó 30.4 veces más, en comparación con el grupo control (HPB) (Figura 5).

Análisis de resultados

Los datos son presentados como una desviación estándar (\pm DE) de la media; la diferencia fue considerada como estadísticamente significativa con $p < 0.05$. Para el análisis y determinación de eficiencias se utilizó el software *REST*® importando los resultados (CTs) obtenidos por PCR en tiempo real. Para la determinación del endógeno se realizó el análisis de la estabilidad (gen no regulado) y se utilizó el software *BestKeeper*, el cual crea un índice de estabilidad al comparar los cuatro genes candidatos endógenos. El más estable para la validación interna de este estudio fue el gen GAPDH.

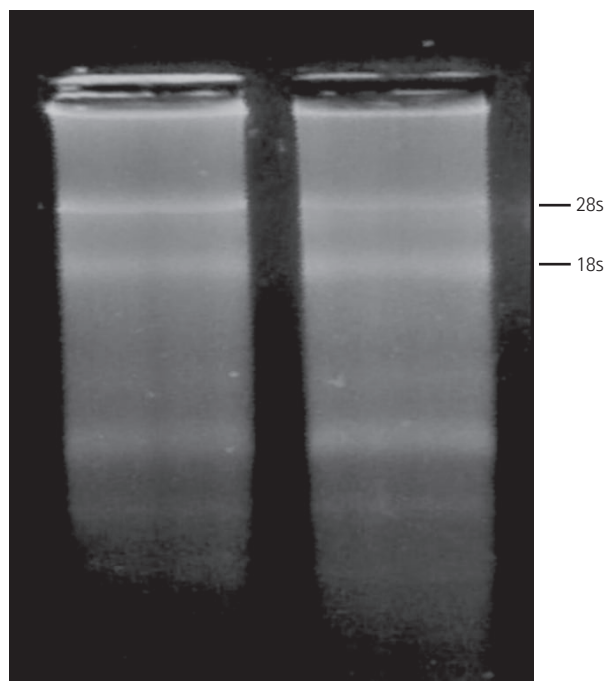


Figura 1. Electroforesis representativa de los RNA extraídos de los tejidos con CaP e HPB (150ng), en gel de agarosa al 2.0%. Se observan las bandas características de las subunidades 18s y 28s, las cuales nos indican que no hay evidencia de degradación de las muestras.

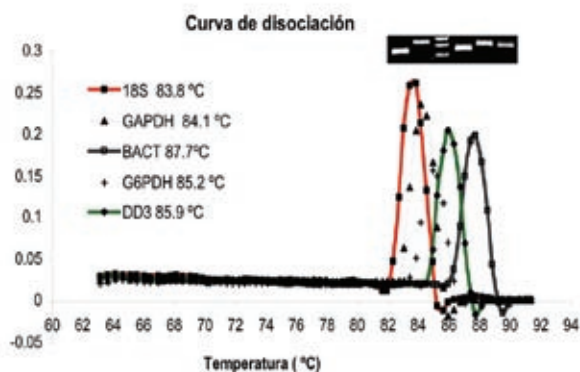


Figura 3. Curvas de disociación de los productos de los genes analizados. Los datos se exportaron del software *Rotor-Gene 6.0* (Corbett Life Science, Sidney City, Australia). El análisis de las curvas de disociación es un método rápido y exacto para observar la especificidad de los productos amplificados. Cuando hay un solo pico en el producto de amplificación, éste representa un solo producto amplificado como se ve en la electroforesis (ver Figura 2) en la parte superior de la figura. Las gráficas representan las temperaturas de disociación (*melting*) en °C: DD3, 87.7°C; BACT, 86°C; 18s, 85.9°C; G6DPH, 83.5 °C y GADPH, 84.1 °C.

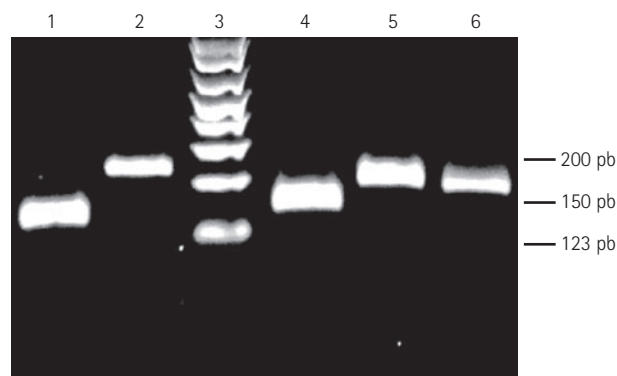


Figura 2. Productos de la amplificación por RT-PCR en tiempo real, con las muestras de RNA total de CaP e HPB. El carril (1) es el producto de la amplificación del gen BACT (143pb), carril (2) GAPDH (175pb), carril (3) marcador de 123pb, carril (4) subunidad 18s (151pb), carril (5) G6PDH (159pb) y carril (6) DD3 PCA3 (156pb).

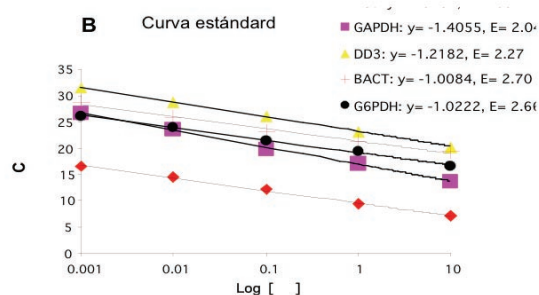
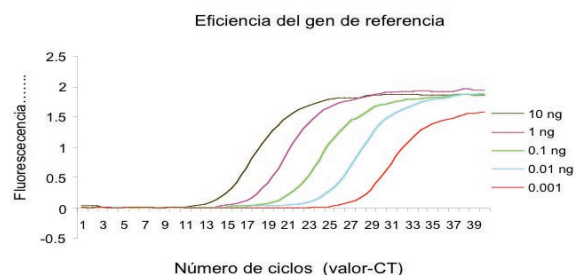


Figura 4. Determinación de las eficiencias de amplificación de los primers: GAPDH, 18s, DD3, BACT, G6PDH. Los CTs se importaron del programa *Rotor-Gene 6.0*, y se graficó la regresión lineal: el logaritmo de la concentración de RNA total contra el CT, la pendiente fue determinada (media \pm DE; $n = 3$) como se observa en (B). La eficiencia correspondiente de cada primer fue calculada de acuerdo con la ecuación 1 del software *REST*. En (A), curvas de amplificaciones de las diluciones seriadas del gen endógeno de referencia que se utilizó para normalizar la carga de RNA total, se grafica fluorescencia relativa contra los CTs, de las diluciones seriadas de RNA total (0.001 a 10 ng). En (B) el promedio del coeficiente de correlación Pearson fue de: $(r) > 0.9948$.

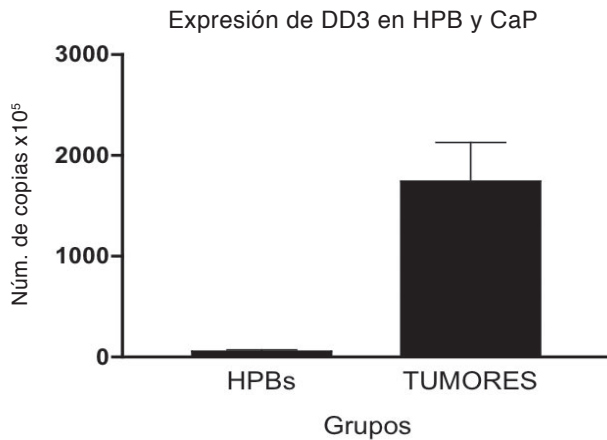


Figura 5. Expresión génica de *DD3^{PCA3}* en HPB y en CaP; n= 20 en ambos grupos, *DD3^{PCA3}* en CaP se sobreexpresa 30.4 veces más que en HPB (t test, $p < 0.0001$), HPB: media $57.40 \pm \text{SEM}$, mínima y máxima expresión de 13-239; CaP: media $1745 \pm \text{SEM}$, mínima y máxima expresión de 171-6200.

Para comparar la expresión absoluta del gen DD3PCA3 y GAPDH, en ambas muestras (HPB y CaP), se utilizaron curvas estándar para ambos genes, y se normalizó la carga del RNA total con el mencionado gen de referencia, como se describe en la metodología, verificando previamente la especificidad de los productos amplificados (Figura 3).

DISCUSIÓN

En nuestro estudio realizamos la cuantificación absoluta del número de copias del mRNA del gen DD3PCA3 en 20 muestras de tejido con diagnóstico de cáncer próstata y en 20 tejidos con hiperplasia prostática benigna; desarrollamos un método adecuado para realizar esta cuantificación. En 1999, Bussemaker y colaboradores¹⁶ compararon la expresión de este gen en tejidos prostáticos sin patología y con neoplasia; en ella encontraron que 53 de 56 tumores tenían sobreexpresado el gen DD3PCA3. En nuestro estudio, 18 de 20 tejidos (90%) con CaP tuvieron sobreexpresado el gen; este reporte indica que es uno de los genes más específicos de cáncer de próstata.

En 2002, Kok y colaboradores²⁴ desarrollaron su metodología para cuantificar este gen y encontra-

ron que la expresión es muy baja en tejido sano de próstata, en comparación con CaP, y encontraron 34 veces más expresado el gen DD3PCA3, y seis veces más que el hTERT; juntos mostraron una sensibilidad y especificidad muy alta, con índice AUC-ROC de 0.98, con expresión media de 5849 para DD3PCA3. En nuestro estudio encontramos una expresión media de 1745 para los tejidos con CaP, y de 57.4 para las HPB.

Este autor ya reportaba la posible aplicación clínica del uso de este marcador para las biopsias prostáticas o incluso en fluidos corporales. En otro estudio en 2003, Hessel y colaboradores^{29,34} encontraron que el estudio por RT-PCR en tiempo real puede detectar especímenes con menos de 10% de células neoplásicas. Asimismo, reportaron 95% de sobreexpresión de las muestras estudiadas (90% en nuestro estudio realizado), con sensibilidad de 67%, un valor predictivo negativo de 90%, y describe la posibilidad de poder desarrollar determinaciones en orina y eliminar biopsias innecesarias.

En 2004, Landers³⁵ describió cuatro biomarcadores (UDP-N-Acetil-alfa-D-galactosamina transferasa, PSMA, hepsina y DD3PCA3). Con el análisis por RT-PCR al gen DD3PCA3, reportó una sobreexpresión de 140 veces más ($p = 0.07$) en cáncer. En comparación con el BPH, la sobreexpresión en nuestro estudio fue de 30.4 veces más. El mismo autor, con un modelo de regresión logística aplicado a los cuatro genes estudiados, determinó 100% de discriminación entre una patología neoplásica y una benigna de próstata.

Los estudios hasta ahora han mostrado consistencia, y en la actualidad se encuentran en desarrollo más de 200 marcadores genéticos para el cáncer de próstata, ya que el PSA está pobremente relacionado con el grado y estadio del cáncer de próstata;³⁶ el gen DD3PCA3 muestra características prometedoras, pero aún no ha sido validado completamente para su aplicación clínica.

Las diferencias en nuestro estudio con los antes mencionados, se deben por una parte a la complejidad inherente de la técnica; y por otro lado, en los estudios de otros autores no se toma en cuenta, o al menos no lo mencionan, la necesidad de incluir la metodología de validación del endógeno adecuado, ya que la normalización de la carga del RNA es crítica para obtener resultados adecuados

y reproducibles.³² Nuestros hallazgos difieren muy poco con los encontrados en la literatura, lo que hace a este gen DD3PCA3 un consistente candidato para ser utilizado como marcador tumoral en el diagnóstico de cáncer de próstata, utilizando estas determinaciones en biopsias prostáticas e incluso determinaciones en orina, metodología ya en desarrollo.^{26,29,34,37,38}

BIBLIOGRAFÍA

- Hall SE, Holman C, Wisniewski ZS, Semmens J. Prostate cancer: socio-economic, geographical and private-health insurance effects on care and survival. *BJU Int*. 2005;95(1):51-8.
- Haas GP, Sakr WA. Epidemiology of prostate cancer. *CA Cancer J Clin*. 1997;47(5):273-87.
- Jemal A, Murray T, Ward E, et al. Cancer statistics 2005. *CA Cancer J Clin*. 2005;55(1):10-30.
- Ahmed MM, Lee CT, Oesterling JE. Current trend in the epidemiology of prostatic disease: benign hyperplasia and adenocarcinoma. En: RK Naz (ed), Prostate: Basic and Clinical Aspects, pp. 3-25. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1997.
- Mistry K, Cable G. Meta-analysis of Prostate-Specific Antigen and Digital Rectal Examination as Screening Tests for Prostate Carcinoma. *J Am Board Fam Pract*. 2003;16(2):95-101.
- Lepor H, Owens RS, Rogenes V, Kuhn E. Detection of prostate cancer in males with prostatism. *Prostate*. 1994;25:132.
- Babaian RJ, Johnston DA, Naccarato W, et al. The incidence of prostate cancer in a screening population with a serum prostate specific antigen between 2.5 and 4.0 ng/ml: relationship to biopsy strategy. *J Urol*. 2001;165(3):757-60.
- Catalona WJ, Smith DS, Ornstein DK. Prostate cancer detection in men with serum PSA concentrations of 2.6 to 4.0 ng/ml and benign prostatic examination: enhancement of specificity with free PSA measurements. *JAMA*. 1997;277:1452-55.
- Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, et al. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level < or 4.0 ng per milliliter. *N Engl J Med*. 2004;350(2):2239-46.
- Kupelian PA, Elshahh M, Reddy CA, Zippe C, Klein EA. Comparison of the efficacy of local therapies for localized prostate cancer in the PSA era: large single institution experience with radical prostatectomy and external beam radiotherapy. *J Clin Oncol*. 2002;20(16):3376-85.
- Kupelian PA, Potters L, Khuntia D, et al. Radical prostatectomy, external beam radiotherapy <72 Gy, external beam radiotherapy ≥72 Gy, permanent seed implantation, or combined seeds/external beam radiotherapy for stage T1-T2 prostate cancer. *Intl J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004;58:25-33.
- Van Iersel MP, Witjes WP, de la Rosette JJ, Oosterhof GO. Prostate specific antigen density: correlation with histological diagnosis of prostate cancer, benign prostatic hyperplasia and prostatitis. *Br J Urol*. 1995;76:47-53.
- Crawford E, DeAntoni E, Ross C. The role of prostate-specific antigen in the chemoprevention of prostate cancer. *J Cell Biochem*. 1996;25(Suppl):149-155.
- Carter HB, Morrell CH, Pearson JD, et al. Estimation of prostatic growth using serial prostate-specific antigen measurements in men with and without prostate disease. *Cancer Res*. 1992;52:3323-8.
- Paul B, Dhir R, Landsittel D, et al. Detection of prostate cancer with a blood-based assay for early prostate cancer antigen. *Cancer Res*. 2005;65:4097-100.
- Bussemakers MJ, van Bokhoven A, Verhaegh GW, et al. DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res*. 1999;59(23):5975-9.
- Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science*. 2005;310:644-8.
- Landers KA, Burger MJ, Purdie MD, Scells B, et al. Use of multiple biomarkers for a molecular diagnosis of prostate cancer. *Int J Cancer*. 2005; 114(6): 950-6.
- de Kok JB, Zendman AJ, van de Locht LT, Ruers TJ, van Muijen GN, Mensink E, Swinkels DW. Real-time hTERT quantification: a promising telomerase-associated tumor marker. *Lab Invest*. 1999;79:911-2.
- Xu LL, Stackhouse BG, Florence K, et al. PSGR, a novel prostate-specific gene with homology to a G protein-coupled receptor, is overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res*. 2000;60:6568-72.
- Srikantan V, Zou Z, Petrovics G, Xu L, et al. PCGEM1, a prostate-specific gene, is overexpressed in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:12216-21.
- Schalken JA, Hessels D, Verhaegh G. New targets for therapy in prostate cancer: differential display code 3 (DD3(PCA3)), a highly prostate cancer-specific gene. *Urology*. 2003;62(Suppl 1):34-43.
- Hessels D, Verhaegh GW, Schalken JA, Witjes A. Applicability of biomarkers in the early diagnosis of prostate cancer. *Expert Rev Mol Diagn*. 2004;4:513-26.

24. De Kok JB, Verhaegh GW, Roelofs RW, *et al.* DD3 (PCA3), a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors. *Cancer Res.* 2002;62(9):2695-8.
25. Schalken JA, Hessels D, Verhaegh G. New targets for therapy in prostate cancer: differential display code 3 (DD3(PCA3)), a highly prostate cancer-specific gene. *Urology.* 2003;62(Suppl 1):34-43.
26. Bostwick DG, Gould VE, Marberger M. Prostate cancer detected by uPM3: radical prostatectomy findings. *Modern Pathology.* 2006;19:630-3.
27. Fradet Y, Saad F, Aprikian A, Dessureault J, *et al.* uPM3, a new molecular urine test for the detection of prostate cancer. *Urology.* 2004;64(2):311-6.
28. Gandini O, Luci L, Stigliano A, *et al.* Is DD3 a new prostate-specific gene? *Anticancer Res.* 2003;23(1A): 305-8.
29. Hessels D, Klein Gunnewiek JM, van Oort I, *et al.* DD3 (PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *Eur Urol.* 2003;44(1):8-16.
30. Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* 1996;6(10):1095-2001.
31. Haberhausen G, Pinsl J, Kuhn CC, Markert-Hahn C. Comparative study of different standardization concepts in quantitative competitive reverse transcription-PCR assays. *J Clin Microbiol.* 1998;36:628-33.
32. Pfaffl MW, Tichopad A, Prqomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Lett.* 2004;26(6):509-15.
33. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(9):e36.
34. Hessels D, Klein Gunnewiek JM, van Oort I, Karthaus HF, van Leenders GJ, van Balken B, *et al.* DD3(PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *Eur Urol.* 2003;44(1):8-16.
35. Landers KA, Burger MJ, Tebay MA, Purdie DM, Scells B, Samaratunga H, Lavin MF, Gardiner RA. Use of multiple biomarkers for a molecular diagnosis of prostate cancer. *Int J Cancer.* 2005;114(6):950-6.
36. Tasken KA, Angelsen A, Svindland A, Eide T, Berge V, Wahlquist R, Karlsen S. Markers for diagnosis, prediction and prognosis of prostate cancer [abstract]. *Tidsskr Nor Laegeforen.* 2005;125(23):3279-82.
37. Fradet Y, Saad F, Aprikian A, Dessureault J, *et al.* uPM3, a new molecular urine test for the detection of prostate cancer. *Urology.* 2004;64(2):311-6.
38. Bostwick DG, Gould VE, Qian J, Susani M, Marberger M. Prostate cancer detected by uPM3: radical prostatectomy findings. *Mod Pathol.* 2006;19(5):630-3.